

Die Konservierung von Eberspermien in einem CO₂-bildenden Verdünner

Benno Schmalfeldt

=

1965.

Aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung
der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Leiter: Professor Dr. W. Leidl

DIE KONSERVIERUNG VON EBERSPERMIEN
IN EINEM CO₂-BILDENDEN VERDÜNNER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München
von

Benno Schmalfeldt
aus Passin/Krs. Bützow

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. L. Kotter

Referent: Professor Dr. W. Leidl

Tag der Promotion: 28. Juli 1965



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Literatur	2
Material und Methodik	9
Versuche	11
Diskussion	31
Zusammenfassung	34
Literaturverzeichnis	35



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Die Künstliche Besamung beim Schwein hat neben der Rinderbesamung in den letzten Jahren wesentlich an Bedeutung gewonnen. Die Befruchtungsergebnisse reichen allerdings noch nicht an die beim natürlichen Deckakt erzielten heran. Als Grund hierfür sind vor allem zwei Probleme in Betracht zu ziehen: einmal die Schwierigkeit, während der relativ langen Brunst des Schweines den günstigsten Besamungszeitpunkt festzustellen, zum anderen aber die noch ungenügend gelöste Frage der Konservierung des Eberspermas.

Die besten Ergebnisse auf diesem Gebiet werden heute mit dem CO₂-Inaktivierungsverfahren erzielt. Dabei werden zwei Wege beschritten: entweder erfolgt die Inaktivierung der Samenzellen durch Medien, die mit CO₂ angereichert wurden, oder aber das Gas wird direkt in das unverdünnte Ejakulat eingeleitet (10, 11, 12).

In der vorliegenden Arbeit wird ein Verfahren untersucht, bei welchem die CO₂-Anreicherung im Verdünner durch einen chemischen Umsetzungsprozeß - also nicht auf mechanischem Wege durch Einleiten des Gases - erzielt wird. Das Sperma wird hier im Gegensatz zur bisherigen Methodik schon während der Samenentnahme im CO₂-absplattendem Verdünner aufgefangen. Dadurch sollen nach Möglichkeit die stoffwechselanregenden Effekte unterbunden werden, die die aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen stammenden Ejakulatsanteile auf die Spermatozoen ausüben und der für die Spermien während der Nebenhodenlagerung typische Zustand der Anabiose aufrechterhalten oder zumindest sofort wieder hergestellt werden.

LITERATUR

1. DAS EJAKULAT DES EBERS

Die Ejakulation erfolgt beim Eber in einzelnen Phasen (Fraktionen). Im ganzen werden drei Sekretschübe abgegeben, die in der Literatur teilweise unterschiedlich benannt werden (20).

Folgende Bezeichnungen werden gebraucht:

- | | |
|--|--------------|
| 1) Vorphase,
(pre-sperm-fraction) | erste Phase |
| 2) I. Hauptphase
(sperm-rich-fraction) | zweite Phase |
| 3) II. Hauptphase
(post-sperm-fraction) | dritte Phase |

Die Vorphase beginnt beim Vorspiel mit der Erektion und endet mit dem Aussetzen der Friktionsbewegungen (6). Ejakuliert wird das wässrig-schleimige Sekret der Urethraldrüsen. Das Sekret enthält keine Spermien (13, 18, 27). Bei Verwendung des Ejakulates für die Künstliche Besamung ist das Sekret der Urethraldrüsen unerwünscht, da es keine lebensverlängernde Wirkung auf die Spermien ausübt (24).

In der I. Hauptphase wird der Hauptteil der Spermien - nach MANN (13) mit einer Konzentration bis zu $4 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ - vermischt mit dem hellwässrigen Sekret der Prostata, dem milchig-weißen Sekret der Samenblasen und teilweise schon mit dem Bulbourethraldrüsensekret in mehreren Schüben entleert.

Mit der II. Hauptphase wird der Ejakulationsvorgang abgeschlossen. In dieser Fraktion werden das restliche Samenblasensekret, der Hauptteil des sagokorn-ähnlichen Bulbourethraldrüsensekretes - aus dem nach GLOVER und MANN (5) die post-sperm-fraction hauptsächlich besteht - und nur noch geringe Mengen Spermien (20) ejakuliert.

Die einzelnen Phasen greifen bis zu einem gewissen Grade ineinander über, so daß eine strenge Trennung nicht möglich ist (4, 13). Trotz des großen Volumens des Eber ejakulates macht der aus dem Hoden stammende Anteil am Gesamtejakulat nach MANN (13) nur 3 % aus.

Der Ebersamen unterscheidet sich von dem der anderen Haustiere hinsichtlich Volumen, Spermadichte und chemischer Zusammensetzung. Die Menge des ejakulierten Spermas ist von verschiedenen Faktoren wie Rasse, individueller Veranlagung, Alter, Ernährung und Geschlechtsbeanspruchung abhängig. Daneben ist die Technik der Samenentnahme von Bedeutung; diese soll nach Möglichkeit den natürlichen Verhältnissen angepaßt sein. Als Methode der Wahl hat sich auch beim Eber die Spermagewinnung mit der künstlichen Scheide erwiesen.

Das Volumen des Gesamtejakulates wird von GOETZE (6) für Eber der Rasse des veredelten Landschweines mit durchschnittlich 320 ml angegeben. Außerdem sind im Schrifttum unter anderem folgende Werte für die Menge des ejakulierten Spermas zu finden: 375 (240 - 500) ml (5), 200 (100 - 500) ml (18), 160 (80 - 300) ml (9) und 153 (30 - 300) ml (19).

Die gleichen Faktoren, die die Samenmenge beeinflussen, wirken sich auch auf die Dichte der Ejakulate aus, wobei der Geschlechtsbeanspruchung besondere Bedeutung zukommt (9). Die Durchschnittswerte für die Spermadichte liegen zwischen 100 000 und 300 000 Spermien pro mm^3 . In der Literatur sind z. B. folgende Angaben zu finden: 250 000 (50 000 - 1 000 000) (6), 100 000 (10 000 - 1 000 000) (18), 220 000 (60 000 - 611 000) (9), 50 000 - 177 000 (5).

Der pH-Wert des Gesamtejakulates liegt bei Extremwerten von 7,0 bzw. 7,8, durchschnittlich bei 7,4 (6) bzw. 7,4 bis 7,6 (9).

Ausführliche Angaben über die chemische Zusammensetzung des Eberspermas macht MANN (14). Die Spermien gewinnen ihre Bewegungsenergie entweder durch den glykolytischen oder durch den respiratorischen Stoffwechsel. Der respiratorische Stoffwechsel setzt die Gegenwart von Sauerstoff voraus; dabei wird durch den Abbau von Milchsäure zu CO_2 und H_2O sowie die Verwertung von Spermainhaltsstoffen zusätzliche Energie gewonnen.

Der Stoffwechsel der Eberspermien unterscheidet sich in verschiedener Hinsicht von dem der Spermien anderer Haustiere (1).

Unter anaeroben Verhältnissen bauen Eberspermien Fruktose in viel geringerem Umfange ab als z. B. Schafbock- oder Bullenspermien. Die Beweglichkeit ist dabei deutlich unterdrückt. Unter aeroben Bedingungen wandeln Eberspermien die Fruktose in gleichem oder sogar in geringerem Umfange in Milchsäure um, obwohl die Motilität sehr hoch ist. Neben der Fähigkeit, die anaerob gebildete Milchsäure abzubauen, können die Schweinespermien auf aerobem Wege auch andere oxydable Substanzen, wie z. B. Glycerin und Essigsäure, verwerten. Im Gegensatz zu Schafbockspermien fehlt ihnen jedoch die Eigenschaft, Sorbitol zu oxydieren (1).

Außerdem fallen zwei ungewöhnliche Eigenschaften des aeroben Spermastoffwechsels beim Eber auf (1):

- 1) die vermehrte Aufnahme von Sauerstoff bei der Lagerung in vitro,
- 2) das Vorhandensein einer leicht oxydierbaren Substanz im Ebersperma, die als solche die Voraussetzung für die Sauerstoffaufnahme des Plasmas selbst bildet.

2. DIE NEBENHODENLAGERUNG DER SPERMIIEN

Durch die Samenkonservierung sollen außerhalb des Organismus Bedingungen geschaffen werden, die die Spermien über längere Zeit lebens- und befruchtungsfähig erhalten, wobei die Hemmung des Stoffwechsels und die Schaffung

günstiger Verdünnermedien die wichtigsten Faktoren sind. Die im Nebenhoden gelagerten Spermien unterliegen in dieser Hinsicht besonders günstigen physiologischen Verhältnissen. Durch die Sekretion des Nebenhodens erhalten die Spermien Schutzkolloide, durch die ihre Widerstandskraft gegen äußere Einflüsse erhöht wird. Neben der Sekretion findet auch eine Resorption von Stoffwechselprodukten statt (6). Während die ejakulierten Spermien nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen, bleiben die im Nebenhoden gelagerten Zellen über längere Zeit bewegungs- und befruchtungsfähig. Nach MANN (14) behalten beim Kaninchen die im Nebenhoden gespeicherten Spermien mindestens einen Monat lang ihre Befruchtungsfähigkeit.

Im Nebenhoden sind die Spermien unbeweglich oder nahezu unbeweglich; diese Tatsache läßt den Schluß zu, daß die längere Lebensdauer durch die Reduktion aller Stoffwechselvorgänge begründet ist. Dieser Zustand wird auch als Anabiose der Spermien bezeichnet (6).

Das im Nebenhoden gelagerte Sperma bleibt nach MANN (14) nur so lange unbeweglich, wie es nicht mit Sauerstoff oder einer glykolysierbaren Substanz in Berührung gebracht wird. Die dichte Lagerung der Zellen im Nebenhodenschwanz und das schwach saure Milieu begünstigen die Anabiose. Nach GOETZE (6) hat das Nebenhodensperma einen pH-Wert von 5,6 bis 6,8. Der Ruhezustand der Spermien im Nebenhodenschwanz wird auch durch die dort herrschende Temperatur begünstigt. Diese liegt etwa 3 - 4 °C unter der normalen Körpertemperatur (6).

Andere Autoren sehen die Ursache der Unbeweglichkeit der Nebhodenspermien in den hohen Natrium- und Kaliumwerten des Nebhodensekretes. Der Natrium- und Kaliumgehalt ist in den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen im allgemeinen höher als in den übrigen Körperflüssigkeiten, wobei das Nebhodensekret besonders hohe Werte aufweist (14).

Nach SALISBURY und VANDEMARK (23) ist die Gegenwart von Kaliumionen im Nebhodensekret einer der Hauptgründe für die niedrige Stoffwechselaktivität der Nebhodenspermien. Das Verhältnis der Natrium- und Kaliumionen ist somit ein wichtiger Faktor für die Beeinflussung des Stoffwechsels der Spermien nach der Nebhodendpassage.

3. KONSERVIERUNG DES EBERSPERMAS

Ähnlich wie beim Rind sind auch für die Konservierung des Eberspermas zahlreiche Verdüner untersucht worden. Diese lassen sich nach der Art ihrer Schutzkolloide einteilen in Glukose-, Eidotter-, Milch- und kombinierte Verdüner. Ihre Verwendung hängt von der Art und Dauer der beabsichtigten Samenkonservierung ab, wobei die Aufbewahrungstemperatur eine wichtige Rolle spielt. Ausführliche Angaben über die verschiedenen Verdüner für Schweinesperma macht ROTHE (20).

Die von mehreren Untersuchern durchgeführten Versuche zur Spermatiefgefrierung brachten bisher keine zufriedenstellenden Ergebnisse (24).

Die besten Erfolge bei der Aufbewahrung des Eberspermas über einige Tage werden heute mit dem CO_2 -Inaktivierungsverfahren erreicht. Am Bullensperma wurde die Kohlensäureinaktivierung von SALISBURY und VANDEMARK (22) sowie VANDEMARK und SHARMA (25) untersucht. Die Grundlage dieser Versuche beruht auf dem Studium der Nebenhodenverhältnisse. Im Dialyseverfahren konnten die Nährstoffverhältnisse und der Einfluß von Gasen auf den Inaktivierungseffekt studiert werden, wobei die Bedeutung des CO_2 erkannt wurde. Auf Grund der Ergebnisse dieser Versuche wurde der I. V. T. (Illini-Variable-Temperature) -Verdüner entwickelt, der die Aufbewahrung von Bullensperma bei $+22^\circ\text{C}$ (Zimmertemperatur) über längere Zeit hinweg möglich machte. Optimale CO_2 -Konzentrationen im Verdüner bewirkten eine vollständige Inaktivierung, so daß zunächst auf eine zusätzliche Kälteanabiose verzichtet werden konnte. Diese Methode wurde auch von anderen Autoren übernommen und für die Aufbewahrung des verdünnten Spermas bei Kühlschranktemperatur abgeändert und weiterentwickelt. Die guten Ergebnisse, die mit den CO_2 -Inaktivierungsverfahren in der Künstlichen Besamung des Rindes erzielt wurden, führten auch zur Erprobung der Methode bei anderen Tierarten.

Die ersten Untersuchungsergebnisse beim Schwein veröffentlichten DU MESNIL DU BUISSON und DAUZIER (16). Als Puffer fand der von VANDEMARK und SHARMA (25) angegebene I. V. T. -Verdüner ohne Zusatz von Eigelb Verwendung. Der Verdüner wurde bei $+30^\circ\text{C}$ 10 Minuten lang mit Kohlendioxyd durchgast. Danach wurde das filtrierte Sperma mit dem mit CO_2 angereicher-

ten Puffer im Verhältnis 1 : 1 vorverdünnt und in Zuschmelzampullen mit einem Fassungsvermögen von 30 bis 50 ml abgefüllt. Als Aufbewahrungstemperatur wurde $+15^{\circ}\text{C}$ gewählt. Vor der Insemination erfolgte eine Nachverdünnung auf 250 ml mit I. V. T. -Verdüner ohne CO_2 -Anreicherung. Bei Besamungsversuchen unter Praxisbedingungen konnten bei 6059 Besamungen mit bis zu 5 Tage altem Sperma 52,12% Trächtigkeiten erzielt werden (17).

Mit dieser Methode der Kohlensäureinaktivierung von Ebersperma beschäftigen sich weiterhin HAHN (8) und WETTKE und ROHLOFF (26). Bei den Versuchen von HAHN wurde in Zusammenarbeit mit DU MESNIL DU BUISSON das Verfahren in einigen Punkten variiert. Bei einem Samenalter von 1 bis 3 Tagen konnten unter Praxisbedingungen zwischen 65 und 80% Trächtigkeiten nach Erstbesamung erreicht werden.

Die derzeit verwendeten Verdüner für die CO_2 -Inaktivierung von Ebersperma stimmen in ihrer Zusammensetzung weitgehend mit den Medien überein, die VANDEMARK und SHARMA (25) für das Bullensperma entwickelten. Über Inaktivierungsversuche durch Einleiten von CO_2 in unverdünntes Ebersperma berichten hauptsächlich russische Forscher, die dieses Verfahren auch in die Praxis einführten. So konnte KVASNICKIJ (10) nach 72stündiger Lagerung des Samens bei 17 von 24 Sauen eine Gravidität erreichen.

Neben den bisher beschriebenen Methoden, bei denen das CO_2 in den Verdüner oder in das unverdünnte Sperma eingeleitet wurde, sind Verdünerlösungen bekannt, die auf Grund ihrer Zusammensetzung das Gas selbst bilden. EIBL, ZODER und HAHN (3) erprobten 1959 auf Anregung von JAHNE¹ ein solches Verfahren für die Inaktivierung von Bullensperma. Der Verdüner bestand aus zwei Fraktionen, nämlich Natriumbikarbonatlösung einerseits und Zitronensäurelösung andererseits. Beim Zusammengeben beider Flüssigkeiten bilden sich Natriumzitrat und Kohlensäure. Das Sperma wurde mit diesem Verdüner in gewissen Zeitabständen nach der Samengewinnung vermischt. Da das Kohlendioxyd über längere Zeit aus dem Verdüner entweicht, ließen sich in einem bestimmten pH-Bereich beliebige Zwischenwerte erzielen. Tiefe pH-Werte erwiesen sich für die Spermakonservierung als ungeeignet; dagegen konnten bei höheren Werten bessere Ergebnisse erreicht werden. Es wird angenommen, daß eine zu hohe CO_2 -Konzentration im Verdüner sich schädigend auf die Spermien auswirkt.

Zusammenfassend ist zu den bisher beschriebenen Verfahren zu sagen, daß die Ejakulate zunächst routinemäßig gewonnen und danach erst mit dem kohlen-dioxydhaltigen Verdünner vermischt werden bzw. das unverdünnte Sperma mit CO_2 durchgast wird.

Erstmalig beschreiben 1959 GRAVES und SALISBURY (7) ein Verfahren zur Gewinnung nebenhodenähnlicher Spermien. Das Ejakulat wird hier bei der Samenabnahme direkt in dem inhibierenden Verdünner aufgefangen. Dadurch erfolgt die Inaktivierung der Spermien unmittelbar während der Ejakulation, so daß die stoffwechselanregende Wirkung der Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen weitgehend ausgeschaltet wird. Durch das Abdecken des so verdünnten Spermas mit Mineralöl sollte der Sättigungsgrad an CO_2 aufrechterhalten werden.

Spermien, die mit dieser Methode gewonnen werden, erweisen sich bei der Kontrolle als unbeweglich. Proben, die zentrifugiert und gewaschen und danach in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert wurden, zeigten nach kurzer Zeit wieder Beweglichkeit. Der Sauerstoffverbrauch derartiger Proben wurde in 60 Untersuchungen an 15 Ejakulaten bestimmt; hierbei wurden ähnliche Werte ermittelt, wie sie für das Nebenhodensperma bekannt sind.

MATERIAL UND METHODIK

1. VERSUCHSTIERE

Die Versuche wurden in der Zeit von Januar bis September 1964 durchgeführt. Für die Spermagewinnung standen 5 institutseigene Eber und 2 Eber der Bullenprüfstation Südbayern in München-Aubing zur Verfügung. Zum Abschluß der Versuche wurden 5 Sauen besamt. Sämtliche Tiere gehörten der Rasse des Deutschen veredelten Landschweines an und waren in gutem Ernährungs- und Pflegezustand.

2. SPERMAGEWINNUNG

Die Samengewinnung erfolgte fraktioniert mit der künstlichen Scheide nach WILLEMS (27) durch Sprung auf das Phantom (BAIER und GRAUVOGL, 2). Das freie Ende des Scheideninnenschlauches wurde an Stelle eines Samenauffanggefäßes mit einem Trichter versehen, dessen obere Öffnung mit einer 6-8 fachen Lage Gaze zum Abfiltern des sagokornähnlichen Bulbourethraldrüsensekretes abgedeckt war. Durch Überleiten des freien Trichterendes auf bereitgehaltene Auffanggläser konnten jeweils die einzelnen Fraktionen des Ejakulates und - wenn erforderlich - auch bestimmte Teilmengen einer Fraktion gesondert aufgefangen werden.

Für die Untersuchungen wurden nur Samenproben verwendet, deren Daten im Rahmen der in der Literatur als physiologisch bezeichneten Grenzen lagen. Das Volumen der Ejakulate betrug im Durchschnitt (ohne Filtrat) 164 ml, der pH-Wert lag bei 7,4, die Spermienkonzentration bei $210\,000/\text{mm}^3$ (88 000 - 377 000) und die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien bei 78 % (70 - 90). In den Angaben zur Spermienkonzentration wurde das in den ersten 3 Versuchs-

reihen verwendete Sperma aus der I. Hauptphase (20 - 30 ml) nicht berücksichtigt.

3. VERDÜNNER

Der Verdünner wurde nach Angaben von GRAVES und SALISBURY (21) hergestellt und hatte folgende Zusammensetzung:

0,8146 g Natriumbikarbonat
1,7301 g Kaliumbikarbonat
1,8900 g Zitronensäure
100,0 ml Aq. bidest.

Die festen Substanzen dieser Mischung wurden auf der Analysenwaage abgewogen und bei Zimmertemperatur (bzw. wenn erforderlich bei $+37^{\circ}\text{C}$) in Wasser gelöst. Dabei bildet sich durch Umsetzung neben Natrium- und Kaliumzitat eine erhebliche Menge an CO_2 . Durch die Gasanreicherung im Verdünner sollen die im Nebenhoden herrschenden (optimalen) Lagerungsbedingungen für die Spermatozoen auch nach der Ejakulation in vitro initiiert werden. Die oben genannten Autoren untersuchten den Puffer hinsichtlich dieser Eigenschaften am Bullensperma. Im folgenden wurde untersucht, ob und unter welchen Bedingungen dieser Verdünner auch für die Konservierung von Ebersperma geeignet ist. Er wird in den weiteren Abschnitten der Arbeit auf Grund seiner Zusammensetzung als NKZ (Natriumbikarbonat-Kaliumbikarbonat-Zitronensäure)-Verdünner bezeichnet.

VERSUCHE

1. BESTIMMUNG DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION IM NKZ-VERDÜNNER

Beim Auflösen der festen Substanzen des NKZ-Verdünners im Wasser entsteht das Kohlendioxyd unter heftigem Aufschäumen der Flüssigkeit. Die Gaskonzentration ist zu diesem Zeitpunkt am höchsten, der pH-Wert der Lösung demzufolge sehr niedrig. Das CO_2 perlt noch über längere Zeit zur Oberfläche und entweicht in die Atmosphäre; der pH-Wert steigt umso mehr an, je geringer die Gaskonzentration in der Flüssigkeit wird. Durch Variation der Versuchsbedingungen (Zeit zwischen Ansatz und Verwendung des Verdünners, Schütteln des Verdünners und dadurch bedingte Beschleunigung der Gasabgabe, verschiedene Temperaturen) lassen sich in einem bestimmten pH-Wert-Bereich beliebige Zwischenwerte erzielen.

Um die Anstiegskurve der Wasserstoffionenkonzentration im NKZ-Verdünnern festzustellen, wurde nach folgendem Versuchsschema vorgegangen: Jeweils 100 ml NKZ-Verdünnern wurden in Erlenmeyerkolben angesetzt und bei Zimmertemperatur auf ihren pH-Wert überprüft, und zwar

- a) 0, 2, 4, 10, 30, 60 Minuten und 12 Stunden nach Herstellung der Lösung und
- b) 1 und 12 Stunden nach Ansetzen; hierbei wurden die Verdünnergefäße vor der Messung noch zusätzlich eine Minute lang kräftig mit der Hand geschüttelt.

Die Gefäße blieben vor und während der pH-Messung unverschlossen. Die Werte wurden mittels eines geeichten Ionometers festgestellt.

In den Tabellen 1 und 2 sind die Ergebnisse der einzelnen Versuche sowie die Durchschnittswerte angegeben. In Abb. 1 sind die Durchschnittswerte aus Tab. 1 graphisch dargestellt.

Tabelle 1

pH-Werte im NKZ-Verdünner in bestimmten zeitlichen Abständen nach dem Ansetzen.
6 Versuchsreihen mit jeweils 100 cem Verdünner (Temperatur ca. 20 - 22°C).

Zeitpunkt der Bestimmung des pH-Wertes	Nummer des Versuches					
	1	2	3	4	5	6
unmittelbar nach dem Ansetzen	5,6	5,2	5,15	5,75	5,6	5,78
nach 2 Min.	5,67	5,8	5,9	5,87	5,8	5,79
nach 4 Min.	5,85	5,9	6,01	5,8	5,9	5,8
nach 10 Min.	5,88	6,0	6,05	5,83	5,98	5,91
nach 30 Min.	6,1	6,03	6,07	5,96	6,0	5,99
nach 60 Min.	6,1	6,09	6,11	6,07	6,1	6,09
nach 12 Std.	6,11	6,15	6,16	6,1	6,14	6,15
						5,51
						5,88
						5,94
						6,02
						6,09
						6,14

Bildung 1: pH-Werte im NKZ-Verdünner in bestimmten zeitlichen Abständen nach dem Ansetzen. Siehe auch Tab. 1.

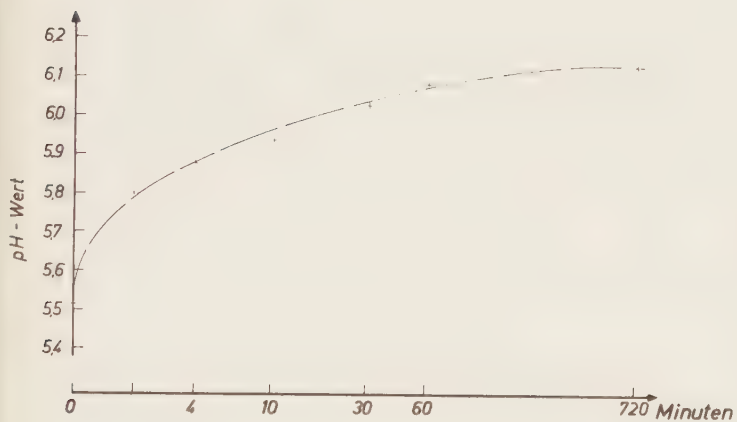


Tabelle 2

pH-Werte im NKZ-Verdünner 1 Stunde und 12 Stunden nach dem Ansetzen.
Zusätzlich wurde der Verdünner vor der Messung jeweils 1 Minute geschüttelt.

Zeitpunkt der Bestimmung des pH-Wertes	Nummer des Versuches						
	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$
nach 1 Std. und zusätzlich 1 Min. geschüttelt	6,19	6,15	6,16	6,15	6,15	6,12	6,15
nach 12 Std. und zusätzlich 1 Min. geschüttelt.	6,22	6,2	6,22	6,16	6,23	6,23	6,21

Aus den Tabellen geht hervor, daß der pH-Wert im NKZ-Verdünner umso mehr ansteigt, je mehr Zeit nach dem Ansetzen des Verdünners verstrichen ist. Der tiefste Wert wurde mit durchschnittlich 5,51 im frisch angesetzten Verdünner ermittelt. Durch das zusätzliche Schütteln bei den Messungen nach 1 und nach 12 Stunden (Tab. 2) ließ sich das Entweichen des Kohlendioxyds und damit der Anstieg des pH-Wertes entsprechend beschleunigen.

Die in Abb. 1 gegebene Kurve der Mittelwerte zeigt, daß sich der pH-Wert in den ersten Minuten nach dem Auflösen der Verdünnersubstanzen entsprechend der anfangs sehr intensiven Gasentwicklung schneller verändert als später.

Mit zunehmender Zeitdauer nach dem Ansetzen des Verdünners flacht sich die Kurve ab; allerdings kann auch nach 12 Stunden noch ein Anstieg des pH-Wertes erzielt werden, wenn die Gasabgabe aus der Lösung durch Schütteln forciert wird (Tab. 2) - ein Zeichen dafür, daß selbst noch nach dieser Zeit eine gewisse Menge Kohlendioxyd im NKZ-Verdünner vorhanden ist.

2. VERSUCHE ZUR SPERMAKONSERVIERUNG

Die Spermienkonservierung durch CO₂-haltige Medien kann nur dann gute Erfolge bringen, wenn die Inaktivierung der Samenzellen unmittelbar nach der Ejakulation einsetzt. Um dies zu erreichen, wurde bei allen im Folgenden beschriebenen Versuchen die Verdünnung schon während der Samengewinnung vorgenommen. Mit Hilfe eines Trichters am Ende des Scheideninnenschlauches wurde das Sperma der I. Hauptphase direkt in den vorbereiteten Verdünner eingeleitet. Das Verdünnungsverhältnis betrug 1 : 10 (10 ml Sperma auf 90 ml Verdünner) und konnte durch Markierungen auf der Außenseite der Gefäße eingehalten werden. Die Pufferlösung wurde bei der Temperatur von +37°C hergestellt bzw. vor der Verwendung auf diese Temperatur gebracht. Als Verdünnergefäße (und gleichzeitig Samenauffanggläser) fanden luftdicht verschließbare Glaskolben Verwendung.

Zunächst war die für die reversible Inaktivierung der Spermien günstigste CO₂-Konzentration im NKZ-Verdünner zu ermitteln. Durch Variieren der Zeitspanne zwischen Ansetzen der Lösung und luftdichtem Verschluß der Gefäße,

die dann nur während der Verdünnung noch einmal kurzzeitig geöffnet wurden, ergaben sich unterschiedliche Gaskonzentrationen.

3. AUFBEWAHRUNG DER VERDÜNNTEN SAMENPROBEN

Das inaktivierte Sperma wurde bei den ersten Versuchen in 1-ml-Zuschmelzampullen aufbewahrt. Pro Samenverdünnung wurden etwa 10 bis 20 Ampullen abgefüllt. Bei weiteren Versuchen fanden 50-ml-Erlenmeyerkolben Verwendung. Der Verschluss bestand aus einem festen, aber nicht luftdichten Mullpfropfen. Die Aufbewahrungsgefäße sollten vor allem hinsichtlich ihres Verschlusses und dessen Einflusses auf die CO_2 -Konzentration im verdünnten Sperma überprüft werden. Das inaktivierte Sperma wurde bei Zimmertemperatur (ca. $20 - 22^\circ\text{C}$) sowie im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert.

4 REAKTIVIERUNG UND KONTROLLE DER SAMENPROBEN

Alle Samenproben wurden nach Beendigung der Verdünnungsprozedur (ca. 10 Minuten nach Gewinnung) mikroskopisch untersucht, wobei der Grad der Inaktivierung festgestellt wurde. Die Proben waren bis zu dieser Überprüfung im Wasserbad bei $+37^\circ\text{C}$ gehalten worden.

Bei Anwendung des CO_2 -Inaktivierungsverfahrens befinden sich die Spermien in einer tiefen Anabiose, so daß die einfache Erwärmung des verdünnten Spermas auf dem Heiztisch (bei 37°C) während der mikroskopischen Untersuchung nicht ausreicht, um die Bewegungsaktivität aller reversibel inaktivierten Zellen vollständig wieder herzustellen. Hierzu bedarf es einer besonderen Reaktivierung die durch Erwärmung und Schütteln der Aufbewahrungsgefäße im Wasserbad von $+37^\circ\text{C}$ möglich ist. DU MESNIL DU BUISSON entwickelte eigens zur Reaktivierung des durch CO_2 inaktivierten Eberspermas eine Schüttelmaschine (8).

In den eigenen Versuchen fand vor der Untersuchung eine Nachverdünnung der mit NKZ-Verdünner inaktivierten Proben im Verhältnis 1 : 1 bei Zimmertemperatur mit einer Lösung folgender Zusammensetzung (nach KVASNICKIJ, 11) statt:

3,0 g Glukose
0,45 g Natriumchlorid
100,0 ml Aq. bidest.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 1 bis 2 ml des verdünnten Spermas mit der gleichen Menge dieser Lösung im Reagenzglas versetzt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zur möglichst vollständigen Reaktivierung wurden die Gläser zusätzlich ca. 2 bis 5 Minuten mit der Hand geschüttelt. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte im Phasenkontrastmikroskop bei 500facher Vergrößerung. Von jeder Probe wurde in mindestens 5 Präparaten die Motilität der Spermien durch Schätzung ermittelt. Der Heiztisch des Mikroskopes hatte während der Untersuchung eine Temperatur von +37°C. Die Reaktivierung und mikroskopische Beurteilung erfolgte am ersten Tag 4 bis 6 Stunden nach der Verdünnung, danach in Abständen von 24 Stunden.

Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit wurden nicht getrennt geschätzt, da die Erfahrung zeigte, daß beide Bewegungsformen bei durch CO₂ inaktiviertem Sperma je nach Grad der Reaktivierung ineinander übergehen können.

Die anschließend beschriebenen Einzelversuche wurden der besseren Übersicht wegen in Gruppen und diese wiederum in Versuchsreihen unterteilt.

Versuchsgruppe A

Versuchsreihe 1

Zur Feststellung der günstigsten CO_2 -Konzentration im NKZ-Verdüner wurden an je 4 Ejakulaten von 3 Ebern folgende Verdünnervorbereitungen überprüft:

a) frisch angesetzter NKZ-Verdüner (d. h. die Zubereitung erfolgte unmittelbar vor dem Auffangen der Samenproben);

im Falle b) und c) wurden die Verdünnergefäße 2 bzw. 4 Minuten offen gehalten, so daß unterschiedliche CO_2 -Mengen aus den Lösungen entweichen konnten.

Die Samenproben wurden im Kühlschrank bei ca. $+4^\circ\text{C}$ in 1-ml-Zuschmelzampullen aufbewahrt.

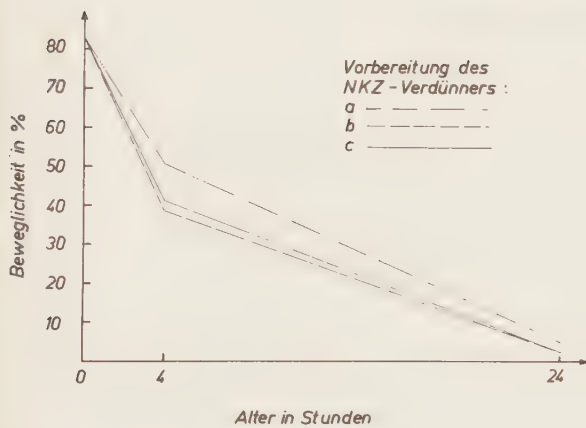
Die Reaktivierung und mikroskopische Beurteilung erfolgte in Abständen von 4 und 24 Stunden nach Verdünnung (Tab. 3, Abb. 2).

Tabelle 3

Prozentsatz motiler Spermien nach der Reaktivierung (Mittelwerte und Standardabweichung) von 4 Ejakulaten von 3 Ebern bei verschiedener Vorbereitung des NKZ-Verdüners: a) frisch angesetzt, b) 2 Minuten und c) 4 Minuten offengehalten. Verdünnungsverhältnis 1 : 10, Aufbewahrung in 1-ml-Zuschmelzampullen bei ca. $+4^\circ\text{C}$.

Alter in Stunden	Beweglichkeit in %					
	a)		b)		c)	
	$\bar{x}$	$\pm_s$	$\bar{x}$	$\pm_s$	$\bar{x}$	$\pm_s$
4	51,2	16,5	38,7	13,2	41,2	17,5
24	5	10	2,5	5	2,5	5

Abbildung 2: Prozentsatz motiler Spermien nach der Reaktivierung.
Siehe auch Tab. 3.



Da die Proben dieser Versuchsreihe nach der Reaktivierung nur unbefriedigende Ergebnisse hinsichtlich Bewegungsintensität und Lebensdauer zeigten, wurden in einer weiteren Versuchsreihe niedrigere CO_2 -Konzentrationen im NKZ-Verdüner sowie die Aufbewahrungstemperatur von $-20 - 22^\circ\text{C}$ (Zimmertemperatur) untersucht.

Versuchsreihe 2

Bei gleicher Verdünnungstechnik wie bei Versuchsreihe 1 fanden folgende Verdünnervorbereitungen Verwendung:

NKZ-Verdüner, deren Ansatzgefäße erst

- c) 4 Minuten
- d) 30 Minuten und
- e) 60 Minuten nach der Zubereitung luftdicht verschlossen wurden.

Im Falle e) wurde die Lösung zusätzlich eine Minute lang geschüttelt, damit weitere CO_2 -Mengen freigesetzt werden konnten.

Die weitere Versuchsanordnung stimmt mit der der Versuchsreihe 1 überein, nur wurde hier die eine Hälfte der Ampullen im Kühlschrank und die andere bei Zimmertemperatur aufbewahrt und die mikroskopische Untersuchung in 24stündigen Intervallen bis zum 3. Tag durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 und Abb. 3 dargestellt.

Versuchsreihe 3

Im Anschluß an die vorigen Untersuchungen wurden NKZ-Verdüner überprüft, die nach folgendem Schema vorbehandelt worden waren:

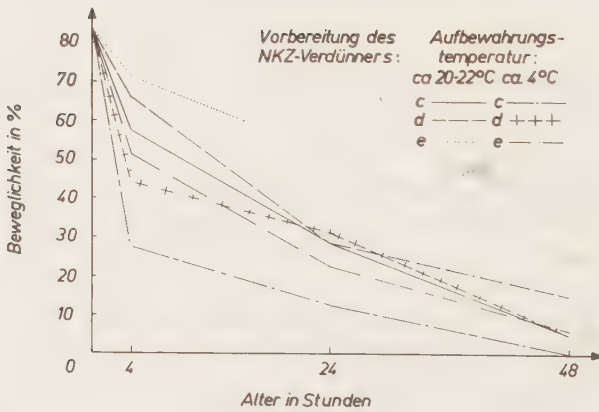
- e) Lösungen, deren Ansatzgefäß 60 Minuten offen blieb und zusätzlich eine Minute lang geschüttelt wurde (siehe Versuchsreihe 2),
- f) Lösungen, deren Ansatzgefäß 12 Stunden offen blieb und ebenfalls zusätzlich eine Minute geschüttelt wurde.

abelle 4

prozentsatz motiler Spermien nach der Reaktivierung (Mittelwerte und Standardabweichung) von 4 Ejakulaten von 3 Ebern bei verschiedener Vorbereitung des Verdünners: c) 4 Minuten offengehalten, d) 30 Minuten offengehalten, e) 60 Minuten offengehalten und zusätzlich danach 1 Minute geschüttelt. Verdünnungsverhältnis 1 : 10. Aufbewahrung in 1-ml-Zuschmelzampullen bei Zimmertemperatur (ca. 20 - 22°C) bzw. bei Kühlschranktemperatur (ca. +4°C).

Alter in Stunden	Aufbewahrungs- temperatur in °C	Beweglichkeit in %					
		c)		d)		e)	
		$\bar{x}$	$\pm_s$	$\bar{x}$	$\pm_s$	$\bar{x}$	$\pm_s$
4	20 - 22	57,5	18,9	66,2	12,5	71,2	20,97
	4	27,5	29,9	43,7	33,8	51,2	31,1
24	20 - 22	28,7	27,2	28,7	27,8	51,2	35,2
	4	12,5	15,0	31,2	36,1	22,5	28,7
48	20 - 22	5,0	5,74	15,0	23,81	26,2	24,96
	4	0	0	5,0	10,0	6,25	6,25
72	20 - 22	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

Abbildung 3: Prozentsatz motiler Spermien nach der Reaktivierung.
Siehe auch Tab. 4



Der Verdünner wurde im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen bei Zimmertemperatur zubereitet und erst vor der Spermagewinnung durch ein Wasserbad auf $+37^{\circ}\text{C}$ erwärmt.

Das inaktivierte Sperma wurde bei diesen Versuchen zu je 50 ml in Erlenmeyerkolben von entsprechendem Fassungsvermögen abgefüllt.

Die Proben wurden im Kühlschrank (ca. $+4^{\circ}\text{C}$) bzw. bei Zimmertemperatur (ca. $20 - 22^{\circ}\text{C}$) gelagert.

Für die Untersuchungen standen 11 Ejakulate von 4 Ebern zur Verfügung. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefaßt, die Mittelwerte in Abb. 4 graphisch dargestellt.

Ergebnisse der Versuchsgruppe A

Bei der Erstuntersuchung der Samenproben erwies sich, daß die Inaktivierung i) Spermien mit den Verdünnervorbereitungen a) bis e) nahezu vollständig war. Zehn Minuten nach Abschluß der Samenverdünnung zeigte nur noch eine geringe Anzahl Spermien Motilität, wobei es sich um zuckende und pendelnde Bewegungen handelte. Dagegen war die Inaktivierung durch die Verdünnervorbereitung f) nicht vollständig. Durchschnittlich zeigten 10 % der Spermien Beweglichkeit, und zwar teilweise Vorwärts-, meist aber Ortsbewegung.

Außerdem konnte festgestellt werden, daß die Zellen ihre volle Bewegungsaktivität hier auffallend schnell wiedererlangten. Über Lebenskraft und Lebensdauer des verdünnten Spermas waren in Zuschmelzampullen schlechter als bei Lagerung in nicht luftdicht verschlossenen Erlenmeyerkolben. Die günstigsten Werte konnten mit der Verdünnervorbereitung f) (pH 6,19 - 6,21) und bei Aufbewahrung bei Kühlschranktemperatur erzielt werden.

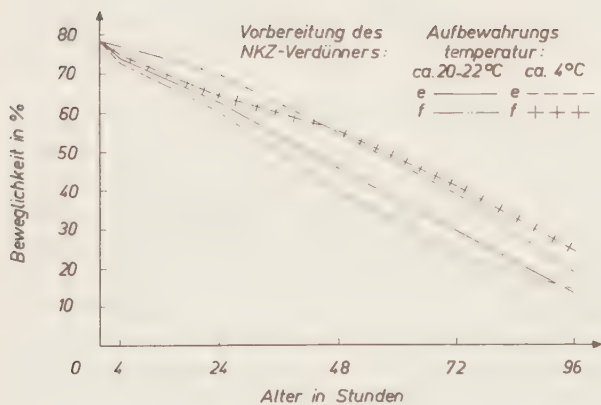
Durch die Verringerung der CO_2 -Konzentration im Verdünnermedium und im verdünnten Sperma konnten die Lebensdauer verlängert und der Prozentsatz der motilen Spermien nach Reaktivierung vergrößert werden.

Tabelle 5

Prozentsatz motiler Spermien nach der Reaktivierung (Mittelwerte und Standardabweichung) von 11 Ejakulaten von 4 Ebern bei verschiedener Vorbereitung des NKZ-Verdünners: e) 60 Minuten offengehalten und zusätzlich danach 1 Minute geschüttelt, f) 12 Stunden offengehalten und zusätzlich danach 1 Minute geschüttelt (pH-Wert: 6,19 - 6,21). Verdünnungsverhältnis 1 : 10, Aufbewahrung in 50-ml-Erlenmeyerkolben bei Zimmertemperatur (ca. 20 - 22°C) bzw. Kühlschranktemperatur (ca. +4°C).

Alter in Stunden	Aufbewahrungs- temperatur °C	Beweglichkeit in %			
		e) $\bar{x}$	$\pm_s$	f) $\bar{x}$	$\pm_s$
4	20 - 22	74,0	8,89	76,8	6,05
	4	73,2	7,18	74,5	7,88
24	20 - 22	62,7	14,2	70,0	8,66
	4	60,4	12,32	64,5	12,53
48	20 - 22	45,5	19,41	54,5	21,72
	4	39,5	11,7	55,0	10,09
72	20 - 22	29,5	22,29	38,6	26,79
	4	23,2	11,66	40,9	24,37
96	20 - 22	13,2	18,19	18,6	27,58
	4	14,1	9,69	24,1	18,68

Abbildung 4: Prozentsatz motiler Spermien nach der Reaktivierung.
Siehe auch Tab. 5.



Versuchsgruppe B

In den bisherigen Versuchen wurde mit verschiedenen Verdünnervorbereitungen eine möglichst günstige CO_2 -Konzentration für die Inaktivierung der Eberspermien ermittelt.

Um nach Möglichkeit den stoffwechselanregenden Einfluß der aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen stammenden Ejakulatsanteile auszuschalten, wurde nur Sperma aus der spermienreichen I. Hauptphase verwendet und das relativ hohe Verdünnungsverhältnis 1 : 10 gewählt. Die Auswertung der Versuchsergebnisse ergab, daß niedrige CO_2 -Konzentrationen in dem mit NKZ-Verdünner gepufferten Sperma (so z.B. bei nicht luftdichtem Verschuß der Aufbewahrungsgefäße) bessere Werte erbrachten als hohe Gaskonzentrationen.

Ergänzend wurden Versuche durchgeführt, die unter Berücksichtigung der bisherigen Erfahrung mit der CO_2 -Konzentration und den pH-Werten des Verdünners dem Nachweis der Befruchtungsfähigkeit des mit dem NKZ-Verdünner behandelten Spermas dienen. Außerdem wurde eine Versuchsanordnung überprüft, die es ermöglichen würde, dieses Verfahren in die Routine der Künstlichen Besamung des Schweines zu übernehmen. Hierfür waren vor allem folgende Überlegungen maßgebend:

- a) Es muß das Gesamtejakulat verwendet werden, da eine fraktionierte Spermagewinnung in der Praxis nur bedingt möglich ist,
- b. das Verdünnungsverhältnis muß so gewählt werden, daß pro Inseminationsdosis eine Gesamtpermienzahl von mindestens 5×10^9 gewährleistet ist (15).

Aus diesem Grunde wurde das Sperma der I. und ein Anteil der II. Hauptphase mit dem NKZ-Verdünner im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Die wässrige Vorphase und der spermienarme Endteil der II. Hauptphase kamen bei diesen Versuchen nicht zur Verwendung.

Als Auffanggefäße zur Spermagewinnung direkt in den NKZ-Verdünner dienten Plastikflaschen mit Schraubdeckelverschluß und einem Fassungsvermögen von 20 bis 50 ml. Zur Hemmung der Keimbesiedlung wurde der NKZ-Verdünner mit einem Antibiotikazusatz versehen. Auf 100 ml Verdünner kamen

100 000 I. E. Penicillin, 0,1 g Dihydrostreptomycinsulfat und 0,3 g Sulfonilamid. Als erste Substanz wurde das Sulfonilamid bei 70 - 80°C in Aq. bidest. gelöst; nach Abkühlung auf 37°C wurden die übrigen Substanzen dazugegeben. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde laufend überprüft und die Lösung unmittelbar vor der Samengewinnung auf einen pH-Wert von 6,19 bis 6,21 eingestellt. Diese Werte ließen sich durch Schütteln der Verdünnergefäße schnell erreichen. Die weitere Versuchsanordnung stimmt mit der der Versuchsgruppe A überein, die Aufbewahrung erfolgte sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei -4°C. Untersucht wurden die Proben zunächst nach 4 Stunden und dann in 24stündigen Intervallen nach der Verdünnung.

Über die Versuchsergebnisse geben Tabelle 6 und Abb. 5 Auskunft.

Ergebnisse der Versuchsgruppe B

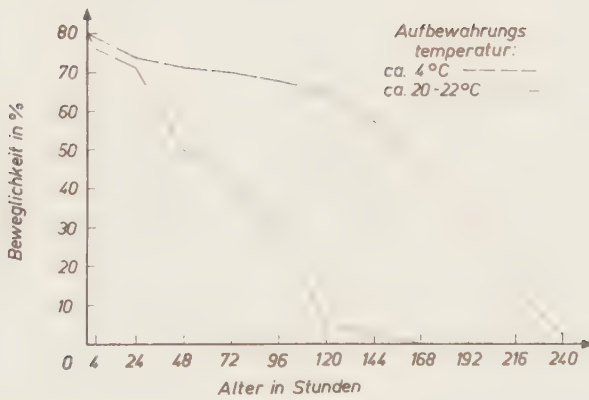
Hier war die Inaktivierung der Spermien bei der mikroskopischen Untersuchung 10 Minuten nach Abschluß der Samenverdünnung unvollständig. Etwa 20 bis 40 % der Spermien zeigten Beweglichkeit, wobei es sich hauptsächlich um Ortsbewegungen handelte. Auffällig war auch hier, daß die Spermien ihre volle Bewegungsaktivität sehr schnell wiedererlangten. Die Lebensdauer der Samenzellen im NKZ-Verdünner konnte durch die gewählte Versuchsanordnung weiter verlängert werden. Auffallend gute Ergebnisse wurden bei Aufbewahrung der Proben bei -4°C erreicht, weitaus schlechtere bei Zimmertemperatur; dies ist wohl auf das verstärkte Keimwachstum zurückzuführen, das trotz des Antibiotikazusatzes nach 2 bis 3 Tagen einsetzte und rasch überhandnahm.

Tabelle 6

Prozentsatz motiler Spermien nach der Reaktivierung (Mittelwerte und Standardabweichung) von 4 Ejakulaten von 2 Ebern. NKZ-Verdünner: eingestellt auf pH-Werte zwischen 6,19 - 6,21. Verdünnungsverhältnis 1 : 1, Aufbewahrung in 200 - 500-ml-Plastikflaschen mit Schraubverschluß bei Zimmertemperatur (ca. 20 - 22°C) bzw. Kühlschranktemperatur (ca. +4°C).

Alter in Stunden	Beweglichkeit in %			
	Aufbewahrungstemperatur in °C			
	20-22	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$
4	76,25	4,8	-	-
24	71,25	8,54	73,75	4,8
48	50,0	33,6	71,25	2,5
72	42,5	29,88	70,0	4,08
96	27,5	32,0	67,5	5,0
120	5,0	5,74	65,0	5,74
144	2,5	5,0	57,5	12,56
168	0	0	47,5	12,56
192	-	-	37,5	12,56
216	-	-	15,0	10,0
240	-	-	2,5	5,74

Abbildung 5: Prozentsatz motiler Spermien nach der Reaktivierung
Siehe auch Tab. 6.



Versuchsbesamungen

Nach Abschluß der Laboruntersuchungen wurden 5 Besamungsversuche durchgeführt. Hierfür stand Sperma von 2 Ebern der Bullenprüfstation Südbayern zur Verfügung. Samengewinnung und Verdünnung des inaktivierten Spermas erfolgten wie unter Versuchsgruppe B beschrieben; aufbewahrt wurden die Proben im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$. Vor der Insemination wurden 70 bis 100 ml des mit NKZ-Verdüner versetzten Samens im Verhältnis 1 : 1 mit der Kochsalz-Glukose-Lösung nach KVASNICKIJ bei einer Temperatur von ca. 25°C nachverdünnt, so daß das endgültige Volumen einer Samendosis 140 bis 200 ml ausmachte. Die Gesamtpermienzahl pro Inseminationsdosis lag zwischen 8 und 15 Milliarden. Die nachstehende Übersicht gibt Auskunft über die einzelnen Besamungen:

Sau	Samenalter	Erfolg
1. Jungsau	7 Stunden	nicht trächtig
2. Altsau	26 Stunden	trächtig - 4 Ferkel
3. Altsau	5 Stunden	nicht trächtig ⁺⁾
4. Altsau	5 Stunden	trächtig - 14 Ferkel
5. Jungsau	32 Stunden	nicht trächtig

⁺⁾ diese Sau wurde auch nach drei weiteren Besamungen nicht mehr trächtig.

Die Besamungsversuche wurden zur Überprüfung der Befruchtungsfähigkeit des mit dem NKZ-Verdüner inaktivierten und konservierten Spermas durchgeführt; darüber hinaus gestatten sie keine weitere Aussage.

DISKUSSION

Bei der üblichen Methode der Spermagewinnung mit der künstlichen Scheide erfahren die aus dem Nebenhodenschwanz ejzierten Spermien genau wie beim natürlichen Deckakt eine intensive Durchmischung mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Dieser Kontakt der Samenzellen mit dem Seminalplasma führt zu entscheidenden Veränderungen im Spermienstoffwechsel, wobei als auffälligstes Merkmal die Auslösung der Motilität zu erwähnen ist. Im Nebenhoden sind die Spermien unbeweglich oder nahezu unbeweglich (14). Als Ursache für diesen anabiotischen Zustand werden vor allem folgende Faktoren genannt:

Niedriger pH-Wert, die dichte Lagerung der Zellen im Nebenhodenschwanz, niedrige Sauerstoffspannung, CO_2 -Anreicherung und Fehlen glykolysierbarer Substanzen sowie die inhibitorische Wirkung von Kalium (6, 23, 14).

Nach der Ejakulation sind die Spermien im Seminalplasma suspendiert. Es stehen ihnen Fruktose und andere glykolysierbare Substanzen zur Verfügung, der pH-Wert des Mediums ist höher, die Viskosität niedriger, die CO_2 -Spannung geringer und die Kaliumkonzentration herabgesetzt (14, 23). Unter diesen Bedingungen erlangen die Spermien ihre volle Motilität. Gleichzeitig wird eine Reihe von anderen spezifischen Stoffwechselleistungen in Gang gesetzt, die auch nach künstlicher Wiederherstellung von nebenhodenähnlichen Umweltsbedingungen nicht mehr reversibel sind. So zeigten gewaschene Nebenhodenspermien in zahlreichen Stoffwechseluntersuchungen ein grundsätzlich anderes Verhalten als durch Waschen von Samenplasma befreite Ejakulatspermien.

Da die Nebenhodenspermien in ihrem optimalen Zustand der Anabiose über längere Zeit befruchtungsfähig erhalten bleiben, ist der Gedanke naheliegend, diesen Zustand durch eine entsprechende Technik der Spermagewinnung und -konservierung auch nach der Ejakulation aufrechtzuerhalten. SALISBURY und Mitarbeiter (7, 21) zeigten, daß eine solche Methode der Spermagewinnung beim Bullen grundsätzlich möglich ist.

Das Ejakulat wird hierbei direkt in einem Verdünnern aufgefangen, der eine relativ hohe Kaliumkonzentration aufweist und in dem es durch die Reaktion von Zitronensäure mit Karbonaten zur Entwicklung von CO_2 kommt. Durch

die schon während der Ejakulation stattfindende starke Verdünnung im Verhältnis von etwa 1 : 10 bis 1 : 20 wird die motilitätsanregende Wirkung des Seminalplasmas weitgehend ausgeschaltet. Stoffwechseluntersuchungen ergaben, daß die mit dieser Methode gewonnenen Spermien im hohen Maße denen des Nebenhodens gleichen, weshalb sie als "epididymallike cells" (ELC) - als nebenhodenähnliche Zellen - bezeichnet wurden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde diese Technik der Samengewinnung mit dem gleichen Verdünnern beim Eber überprüft. Die Ergebnisse zeigten, daß die Methode grundsätzlich auch beim Schwein anwendbar ist. Unter den besonderen Gesichtspunkten der Konservierung von Eberspermien für die Praxis der Künstlichen Besamung stellen sich jedoch einige Probleme, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

In den ersten Versuchen wurde nur Sperma der spermienreichen I. Hauptphase im Verhältnis 1 : 10 verdünnt; sowohl durch die fraktionierte Gewinnung des Ejakulates als auch durch den für Ebersperma relativ hohen Verdünnungsgrad sollten auch hier die stoffwechselanregenden Effekte des Seminalplasmas soweit wie möglich ausgeschaltet werden. Im Unterschied zu hohen CO_2 -Konzentrationen im frisch angesetzten Verdünnern wurde bei niedrigeren Gaskonzentrationen ein höherer Prozentsatz an reversibel inaktivierten Spermien festgestellt. Hohe CO_2 -Konzentrationen und damit niedrige pH-Werte im Verdünnern hatten zwar eine vollständige Hemmung der Spermienmotilität zur Folge (nur wenige Spermien zeigten kurz nach der Verdünnung Beweglichkeit), jedoch konnten die Samenzellen nur kurze Zeit in diesem Milieu lebensfähig erhalten werden. Zu der gleichen Feststellung kommen auch EIBL, ZODER und HAHN (3) bei ihren Versuchen zur Konservierung von Bullensperma mit einem ähnlichen Verdünnern.

Für die CO_2 -Konzentration im verdünnten Sperma ist die Wahl der Aufbewahrungsgefäße - vor allen Dingen ihres Verschlusses - von entscheidender Bedeutung. Zuschmelzampullen erwiesen sich als ungeeignet. Die Fähigkeit des Verdünners, nach der Zubereitung noch über einige Zeit CO_2 abzugeben, führte offenbar zu einem CO_2 -Überdruck, der sich schädigend auf die Spermien auswirkte. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Aufbewahrungsgefäße einen Gasaustausch mit der Atmosphäre ermöglich-

ten. Als gut brauchbar erwiesen sich Erlenmeyerkolben, die mit einem Mullpfropfen verschlossen wurden oder Plastikflaschen mit Schraubverschluß.

Reihenuntersuchungen mit den einzelnen Verdünnervorbereitungen, die nach dem Ansetzen verschieden lange in offenen Gefäßen aufbewahrt wurden, wobei der pH-Wert analog zur Gasabgabe aus der Lösung mit der Dauer der Wartezeit anstieg, führten zu dem Ergebnis, daß Verdünnertlösungen mit einem pH-Wert von 6,19 bis 6,21 die besten Werte hinsichtlich Prozentsatz und Lebensdauer der reversibel inaktivierten Spermien gewährleisten.

Die Aufbewahrung der Samenproben erfolgte bei Zimmertemperatur (ca. 20 - 22°C) und bei Kühlschranktemperatur (ca. +4°C), wobei die Lagerungstemperatur von +4°C hauptsächlich im Hinblick auf die Hemmung der Keimbeseidlung gewählt wurde.

Mit Rücksicht auf die praktischen Erfordernisse der Künstlichen Besamung wurde in weiteren Versuchen Sperma der I. und II. Hauptphase verdünnt. Hierbei wurden die Ergebnisse der vorhergegangenen Versuchsreihen berücksichtigt, d. h. es wurden Verdünnervorbereitungen mit einem pH-Wert zwischen 6,19 und 6,21 verwendet. Für die Lagerung des verdünnten Spermias fanden Plastikflaschen mit einem Fassungsvermögen von 200 bis 500 ml mit Schraubverschluß Verwendung.

Die Inaktivierung der Spermien war bei diesen Versuchen kurze Zeit nach der Verdünnung unvollständig, jedoch konnten bei Reaktivierung der bei +4°C gelagerten Samenproben am 6. Tag nach Gewinnung noch durchschnittlich 65 % bewegliche Zellen ermittelt werden. Dieser Anteil entspricht etwa den Werten, die in der Literatur bei Verwendung von anderen Verdünnern für Ebersperma als optimal angegeben werden. Die schlechteren Ergebnisse der bei +20°C gelagerten Proben sind wohl in erster Linie auf die Keimbeseidlung zurückzuführen, die trotz Antibiotikazusatz spätestens am 3. Tag begann und dann schnell überhandnahm.

Sperma, das unter diesen Bedingungen gewonnen und verdünnt wurde, erwies sich im Besamungsversuch als befruchtungsfähig.

Grundsätzlich konnte bewiesen werden, daß der untersuchte, auf Grund seiner Zusammensetzung Kohlendioxyd bildende Verdüner für die Konservierung von Ebersperma brauchbar erscheint.

ZUSAMMENFASSUNG

An 25 Ejakulaten von 7 Ebern wurde eine neue Methode der Spermakonservierung überprüft. Das Sperma wurde bei der Gewinnung mittels künstlicher Scheide direkt in einem Verdünnungsmedium aufgefangen, in welchem sich durch die Reaktion von Zitronensäure mit Karbonaten CO_2 bildet. Durch die CO_2 -Sättigung und relativ hohe Verdünnung sollten die stoffwechselanregenden Wirkungen des Seminalplasmas bereits bei der Spermagewinnung ausgeschaltet werden. Es wurde der Einfluß der CO_2 -Konzentration und des pH-Wertes im Verdünner auf die Motilität der Spermien während der Lagerung bei $+4^\circ\text{C}$ und bei $+20 - 22^\circ\text{C}$ untersucht.

Bei der alleinigen Verwendung des Spermas der I. Hauptphase der Ejakulate wurden die besten Konservierungsergebnisse erzielt, wenn der Verdünner einen pH-Wert von 6,19 - 6,21 aufwies und das Sperma, im Verhältnis 1 : 10 verdünnt, bei Kühlschranktemperatur in Gefäßen aufbewahrt wurde, die einen Gasaustausch mit der Atmosphäre ermöglichten. Die durchschnittliche Motilität betrug nach Reaktivierung und Nachverdünnung mit Glukose-Kochsalzlösung nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Aufbewahrungsdauer 64,5, 55,0, 40,9 bzw. 24,1 %. Die Aufbewahrung des verdünnten Spermas in Zuschmelzampullen erwies sich als ungeeignet, da in den Ampullen ein Gasüberdruck entstand, der sich schädigend auf die Spermien auswirkte.

Um diese Methode für die praktischen Belange der Künstlichen Besamung zu prüfen, wurde in ergänzenden Versuchen das Sperma der I. und II. Hauptphase sofort bei der Gewinnung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und unmittelbar vor der Insemination nochmals im gleichen Verhältnis nachverdünnt. Mit diesem Verfahren war eine günstige Relation zwischen Volumen und Gesamtspermienzahl pro Inseminationsdosis zu erreichen. Die Proben zeigten bei der angegebenen niedrigen Verdünnung nach 6tägiger Lagerung bei $+4^\circ\text{C}$ eine Motilität von 65 %. In Testversuchen trat bei 2 von 5 Sauen nach einmaliger Besamung eine Konzeption ein.

SUMMARY:

The preservation of boar semen in CO₂ producing diluent.

A new method of sperm preservation was tested on 25 ejaculates from 7 boars. An artificial vagina was employed to collect ejaculates directly into a volumetric flask containing a diluent of citric acid and carbonates which produced CO₂. The combination of effects of buffer solution with CO₂ and high dilution inhibited cell metabolism and motility, which normally is initiated by the seminal plasma. Influence of various CO₂ concentrations and pH values of the diluent on the motility of the spermatozoa during storage at 4°C and at room temperature were studied.

The best conditions for preservation were obtained under the following conditions: Use of the sperm rich fraction only, pH of the diluent between 6,19 and 6,21, dilution ratio 1:10, storage at 4°C in containers which permitted gas exchange with the atmosphere. The average motility of the semen samples reactivated with a glucose-saline solution after 1, 2, 3 and 4 days of storage was 64.5, 55.0, 40.9 and 24.1 % respectively. Storage in sealed glass ampules was not satisfactory as the developing high CO₂ pressure had a deleterious effect on the spermatozoa.

In additional experiments, this method of semen collection and dilution was studied under the special conditions used in artificial insemination. The sperm-rich and post-sperm fractions were diluted 1:1 at the time of semen collection with the CO₂ producing diluent and again immediately prior to insemination 1:1 with the glucose-saline diluter. This procedure resulted in an favorable relation between semen volume and total sperm number per insemination dose. The average motility of the semen samples after 6 days of storage at 4°C was 65 %. In a preliminary fertility test with 5 sows, 2 became pregnant after the first insemination.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Aalbers, J. G., Mann, T. und Polge, C. (1961): Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival. J. Reprod. Fertility 2, 43.
- 2) Baier, W. und Grauvogl, A. (1959): Samenentnahme beim Eber in der tierärztlichen Praxis. Berl. Münchn. tierärztl. Wschr. 72, 150.
- 3) Eibl, K., Zoder, H. F. und Hahn, R. (1959): Stand des CO₂-Inaktivierungsverfahrens des Bullenspermas. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 66, 301.
- 4) Glover, D. T. (1955): The semen of the pig. Vet. Rec. 67, 36.
- 5) Glover, D. T. und Mann, T. (1954): On the composition of boar semen. J. Agr. Sci. 44, 355.
- 6) Goetze, R. (1949): Besamung und Unfruchtbarkeit der Haus-säugetiere. Verlag Schaper, Hannover
- 7) Graves, C. N. und Salisbury, G. W. (1959): The production of epididymal-like ejaculated spermatozoa. J. Dairy Sci. 42, 932.
- 8) Hahn, R. (1963): Zur Konservierung des Ebersamens. Tierärztl. Umschau 18, 165.
- 9) Karg, H. und Leidl, W. (1959): Untersuchungen über die Zusammensetzung von Schweinesperma. Zuchthyg. 3, 232.

- 10) Kvasnickij, A. V. (1959): Méthode fractionnée d'insémination artificielle des truies. Colloque sur la reproduction et l'insémination artificielle du porc.
Ann. Zootechn. (Paris) 8, (Suppl.) 43.
- 11) Kvasnickij, A. V. und Konjuchowa, L. A. (1963): Künstliche Besamung der Schweine. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- 12) Ließ, J. und Grove, D. (1963): Beitrag zur Inaktivierung von Ebersamen durch Begasung des unverdünnten Ejakulates mit Kohlendioxyd.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 70, 433.
- 13) Mann, T. (1961): Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Physiologie und Biochemie der Fortpflanzung der Tiere.
Schweizer Arch. Tierheilk. 103, 359.
- 14) Mann, T. (1961): The biochemistry of semen and of the male reproduction tract.
Methuen and Co. LTD., London, and John Wiley and Sons, Inc., New York.
- 15) Mesnil du Buisson, F. du (1961): Die künstliche Besamung beim Schwein. Chargé des Recherches à l'I.N.R.A. aus der Spezialnr.: L'Elevages des Porcs.
- 16) Mesnil du Buisson, F. du und Dauzier, L. (1958): Maintien du pouvoir fécondant du sperme de verrat en présence de gaz carbonique.
Compt. rend. Acad. Sci. 247, 2472.
- 17) Mesnil du Buisson, F. du und Jondet, R. (1961): Utilisation du CO₂ dans l'insémination porcine.
IV. Int. Kongr. Fortpfl. d. Tiere, Den Haag.
- 18) Polge, C. (1956): Artificial insemination in pigs.
Vet. Rec. 68, 62.

- 19) Rothe, K. (1961): Zur Spermaproduktion beim Eber.
Zuchthyg. 5, 394.
- 20) Rothe, K. (1963): Die künstliche Besamung beim Schwein.
Arch. exp. Vet. Med. XVII, 957 und
1169.
- 21) Salisbury, G.W. und Graves, C.N. (1963): Substrate-free epididymal-like bovine
spermatozoa.
J. Reprod. Fertility 6, 351.
- 22) Salisbury, G.W. und Van Demark, N.L. (1957): Carbon Dioxide as a reversible inhibitor
of spermatozoa metabolism.
Nature 180, 989.
- 23) Salisbury, G.W. und Van Demark, N.L. (1961): Physiology of reproduction and artificial
insemination of cattle.
Freeman and Company, San Francisco
and London.
- 24) Schaetz, F. (1963): Die künstliche Besamung bei den Haus-
tieren.
G. Fischer Verlag, Jena.
- 25) Van Demark, N.L. u. Sharma, U.D. (1957): Preliminary fertility results from the
preservation of bovine semen at room
temperature.
J. Dairy Sci. 40, 438.
- 26) Wettke, K. und Rohloff, D. (1964): Versuche zur Konservierung von Eber-
sperma durch CO₂-Inaktivierung.
Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 77, 8.
- 27) Willems, C.M. (1959): Kunstmatige inseminatie bij varkens.
Tschr. diergeneesk. 84, 208.

Am Ende meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Leidl für die Überlassung des Themas und die stets bereitwillige Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Desgleichen gilt mein Dank Herrn Dr. Berchtold für die mir für meine Untersuchungen gewährte Anleitung und Unterstützung. Ebenso danke ich Herrn Dr. Haeger, der mir für einen Teil der Versuche Sperma von zwei Ebern der Bullenprüfstation Südbayern zur Verfügung stellte.

L e b e n s l a u f

Als Sohn des Landwirts Erich Schmalfeldt und seiner Ehefrau Ilse, geb. Krohn, wurde ich am 9. 5. 1936 in Lübz/Mecklenburg geboren. In Bützow besuchte ich die Volksschule, und anschließend war ich Schüler der dortigen Geschwister-Scholl-Oberschule, wo ich im Jahre 1955 die Reifeprüfung ablegte.

Während des Winter-Semesters 1956/57 studierte ich an der Universität Münster Volkswirtschaft. Das tierärztliche Studium begann ich mit dem Sommer-Semester 1957 an der Tierärztlichen Hochschule Hannover und setzte es mit dem 6. Semester an der Universität München fort. Am 17. März 1962 bestand ich hier das tierärztliche Staatsexamen. Nach Ableistung meiner Veterinär-Praktikantenzeit an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München sowie in der Praxis des Herrn Dr. Gürtler in Prien/Chiemsee arbeitete ich als Assistent, Praxisvertreter und Fleischbeschautierarzt. Seit Oktober 1964 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen eines Forschungsauftrages in der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München tätig.

